UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

FACULTE de MEDECINE . PITIE-SALPETRIERE

N° 143

Année 1975

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplome d'état)

PAR

LEFEVRE ALAIN

NE LE 24 AVRIL 1944 à Rouvres St Jean -Loiret -

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

MODES DE GROUPEMENT DES MITOSES DANS L'ADENOHYPOPHYSE DU RAT MALE PUBERE

Président : Monsieur J. RACADOT., Professeur.

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

FACULTE de MEDECINE . PITIE-SALPETRIERE

Année 1975 **THÈSE** **N°**

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplome d'état)

PAR

LEFEVRE ALAIN

NE LE 24 AVRIL 1944 à Rouvres St Jean -Loiret -

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

MODES DE GROUPEMENT DES MITOSES DANS L'ADENOHYPOPHYSE DU RAT MALE PUBERE

Président : Monsieur J. RACADOT., Professeur.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548117_0004

A Notre Maître et Président de Thèse,

Monsieur le Professeur J. RACADOT

Professeur à la Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière

Chef du Service d'Histologie-Embryologie

qui a bien voulu accepter le présidence de cette Thèse,

pour l'enseignement et l'exemple qu'il nous donne,

qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre respectueuse admiration.

A Monsieur le Professeur Agrégé J.C.NOUET

qui a été l'inspirateur de ce travail.

qu'il soit assuré de notre admiration pour la rigueur de ses méthodes de travail,

qu'il reçoive ici le témoignage de notre sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur L. OLIVIER

En témoignage de notre gratitude pour sa constante amabilité à notre égard.

A Monsieur le Professeur Agrégé R. du BOISTESSELIN

Nous tenons à l'assurer de notre sincère amitié.

A Madame le Docteur M. KUJAS

qui a bien voulu nous aider dans la réalisation de ce travail qu'elle en soit très amicalement remerciée.

A Nos Maîtres d'Externat

Monsieur le Professeur A. SICARD

Monsieur le Professeur M. DAVID

Monsieur le Professeur C. SORS

Monsieur le Docteur G. ALBOT

Monsieur le Docteur J.A. LIEVRE

Monsieur le Professeur J. LAFOURCADE

Monsieur le Professeur E. HERVET

Monsieur le Professeur B. DUPERRAT

A Monsieur le Professeur Jérome LEJEUNE

qui nous a enseigné la Cytogénétique.

PLAN

I - INTRODUCTION

1°) Les mitoses dans l'adénohypophyse

2°) Données numériques récentes

a) Estimation du nombre des mitoses

b) Influence du mode de fixation

c) Rythme nycthéméral des mitoses

II - TECHNIQUE

1°) Le choix des animaux

a) Sexe

b) Conditions d'élevage des animaux

c) Poids des animaux

2°) La perfusion de liquide fixateur

a) Anesthésie

b) Mise en place de la perfusion

c) Perfusion

d) Post fixation

3°) Confection des coupes

a) Inclusion

b) Epaisseur des coupes

c) Coloration

4°) Technique d'observation

a) Grossissement

b) Réticule

c) Carte des mitoses

d) Stades de la mitose

5°) Matériel observé

a) Premier lot de préparations

b) Deuxième lot de préparations

III - RESULTATS

1°) Répartitions des mitoses :

Les "constellations" de mitoses, les "zones sans mitose" et le "bruit de fond"

a) Premier lot de préparations

b) Deuxième lot de préparations

2°) Les "paires " de mitoses.

IV - DISCUSSION

1°) L'existence des "constellations" n'est-elle pas due au hasard ?

2°) Quelle est la forme et quel est le volume des "constellations" et des "zones sans mitose" ?

3°) Quelle est la signification des "zones sans mitoses", des "constellations" et du "bruit de fond" ?

4°) Quelle est la signification des "paires" de mitoses ?

V - CONCLUSIONS

I - INTRODUCTION

Depuis longtemps les biologistes ont opposé multiplication et différenciation cellulaires parce que ces deux phénomènes semblent s'exclure mutuellement dans un certain nombre de circonstances.Lorsqu'une cellule a atteint sa maturité fonctionnelle, elle semble cesser de se diviser, d'où la règle énoncée par A. PRENANT : "toute cellule qui se divise est incapable de produire et ne fonctionne pas". Ultérieurement A. PRENANT a repris cette idée : "une cellule qui est spécialement vouée à la motilité, à l'excitabilité, à la nutrition n'est plus reproductrice. Les cellules musculaires, nerveuses, glandulaires ne se reproduisent pas, ou ne le font qu'exceptionnellement et sans doute au cours d'une longue période de repos fonctionnel. Une cellule nerveuse par exemple,absorbée pour ainsi dire par le travail de la pensée ne se reproduit pas et persiste, a-t-on dit, depuis la naissance de l'être jusqu'à sa fin, devenant centenaire avec lui".

Ces affirmations ont eu une profonde influence. Pendant longtemps on a pensé que dans un organisme adulte, les multiplications cellulaires étaient d'autant plus rares que la cellule était engagée dans une fonction plus différenciée. Dans l'adénohypophyse, ce n'est qu'à partir de 1940 que l'existence des mitoses a été reconnue avec certitude. Différentes hypothèses avaient été émises autrefois pour rendre compte du renouvellement nécessaire des cellules de cette glande :

- Epithélialisation des cellules conjonctives (C.SOYER)
- Multiplication cellulaire par amitose (R. COLLIN)
- Endocytogénèse (R. COLLIN).

1°) Les mitoses dans l'adénohypophyse

L'étude histologique, même sans intervention de technique particulière, démontre qu'il existe des mitoses dans la majeure partie des tissus.

C.P. LEBLOND et B.E. WALKER (1956) avaient classé les tissus en deux catégories :

- ceux qui sont le siège d'un renouvellement actif lié à une élimination cellulaire continue (épithéliums de revêtement par exemple), ou périodique (comme l'appareil génital femelle). Les divisions cellulaires assurent alors le remplacement des éléments qui ont disparu.

- ceux où les multiplications ont un caractère sporadique. Dans ce cas, elles assurent uniquement une hyperplasie qui poursuit, chez l'adulte et au ralenti, l'accroissement pondéral manifesté au maximum chez le jeune. Cette croissance de l'animal adulte persiste chez les rongeurs.

Les divisions cellulaires qui sont observées dans l'adénohypophyse du rat mâle peuvent donc correspondre à la coexistence de deux nécessités :

- remplacement de cellules qui sont éliminées en raison de leur vieillissement,

- apparition de nouvelles cellules.

2°) Données numériques récentes

a) Estimation du nombre des mitoses

Ce n'est que grâce au blocage artificiel de la mitose par l'administration de colchicine à l'animal d'expérience, ou grâce à l'utilisation du marquage par des précurseurs radioactifs permettant la radioauto-

graphie, que différents auteurs, notamment MORATO (1939), SENTEIN et TUCHMANN-DUPLESSIS (1943), KERR (1943), HUNT (1942-1966), LEBLOND (1959) BUGNON (1963-1966) ont pu, d'une part, prouver véritablement l'existence des mitoses dans l'adénohypophyse, et d'autre part évaluer leur fréquence. HUNT en 1948 estime que "le nombre des divisions cellulaires dans l'adénohypophyse du rat mâle âgé de 3 mois est uniformément bas. On observe habituellement 2 ou 3 mitoses et au plus 5 à 10 pour la section entière de l'organe qui représente 5 à 6 mm^2". BUGNON et coll. rapportent un taux de mitoses qui est du même ordre : 3 mitoses par section horizontale.

Mais les chiffres que rapportent ces auteurs sont très nettement inférieurs à ceux que d'autres ont publiés. Cette constatation tient certainement à des conditions expérimentales très différentes.

b) Influence du mode de fixation

NOUET et KUJAS ont montré en 1973 que le mode de fixation influait qualitativement et quantitativement sur l'observation des mitoses dans l'adénohypophyse.

Rappelons ici leurs chiffres

	Fixation par perfusion	Fixation par immersion
Densité mitotique	0,57	0,25
Index mitotique pour 1000 cellules	0,68	0,29

"La densité mitotique après fixation par immersion est donc 2,3 fois moins élevée qu'après fixation par perfusion". Or la fixation par immer-

sion est la technique qui avait toujours été utilisée par les auteurs précédents.

D'autre part, ils ont observé que la répartition des mitoses dans le parenchyme de l'adénohypophyse est très différente suivant la technique de fixation.

Après fixation par perfusion, la répartition topographique s'établit suivant une droite visible dans la figure 1. Il s'agit d'une droite de formule $y = (-0,80 \pm 0,03)x + (17,75 \pm 0,75)$.

Par conséquent "la densité mitotique est la même quelle que soit la profondeur; donc la répartition topographique des mitoses est homogène après fixation par perfusion".

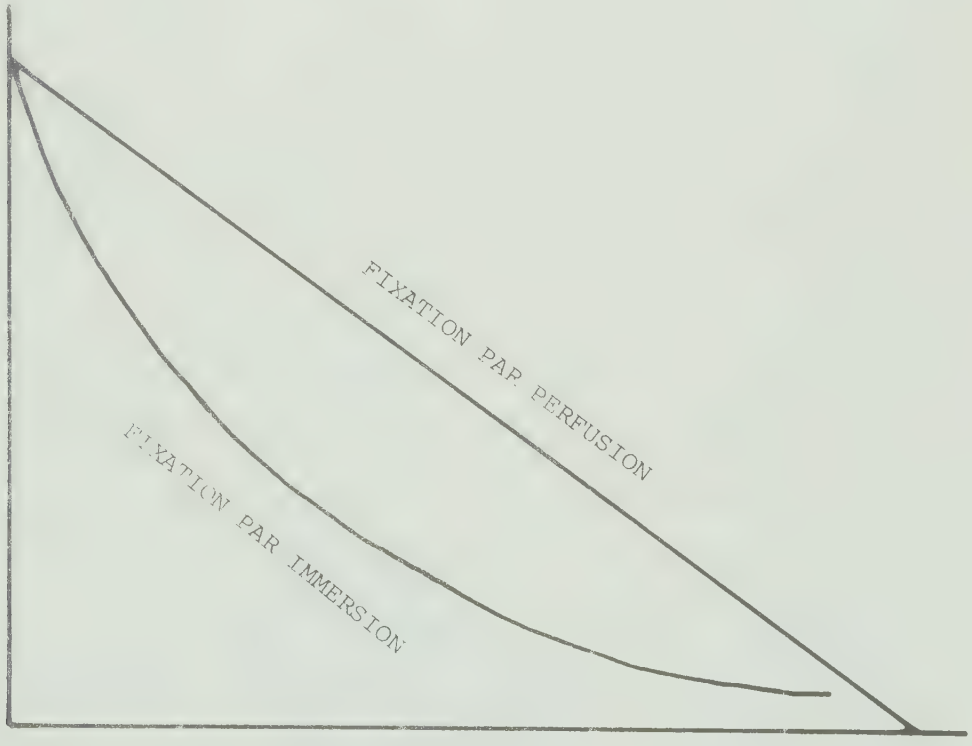

Figure 1 : Comparaison de la répartition des mitoses après fixation par perfusion et après fixation par immersion.(NOUET et KUJAS). Le nombre des mitoses figure en ordonnées et la distance à la périphérie en abscisses.

Dans le cas de la fixation par immersion, la courbe de répartition est une courbe. Cette courbe est statistiquement ajustable à une exponentielle dont la formule est $y = (16,5 \pm 1,5) \exp -(0,142 \pm 0,010)x$
Par conséquent, on en déduit que "la répartition topographique n'est pas homogène" et que "la densité mitotique décroit progressivement de la superficie vers la profondeur après fixation par immersion".
L'espace compris entre les deux courbes représente donc le nombre des mitoses "perdues" lors de la fixation par immersion.

"La différence des résultats doit être attribuée au mode de fixation lui-même. En effet, la fixation par perfusion"saisit" le parenchyme glandulaire de l'intérieur et instantanément, tel qu'il se présente normalement chez l'animal vivant, tant dans son volume que dans sa structure. Par contre, le prélèvement d'un organe frais suivi de sa fixation par immersion ne peuvent respecter ni l'aspect histologique ni le volume réel de l'organe en question.Le prélèvement d'une hypophyse fraîche, pour aussi méticuleux qu'il soit, entraîne nécessairement des tiraillements, des écrasements, qui, aussi minimes soient-ils, peuvent abimer les tissus; de plus, la pénétration du fixateur à l'intérieur d'un organe est lente et progressive. Les lois qui régissent cette progression sont actuellement très mal connues".

"Les temps de fixation sont également sans comparaison. La fixation par perfusion est pratiquement effectuée en 30 secondes, la post fixation de 24 heures ne sert qu'à la compléter. Au contraire, la fixation par immersion est beaucoup plus lente, le liquide fixateur ne pénètre que petit à petit de la périphérie vers le centre de l'organe qui y est immergé.Il faut de une à quatre heures pour que le liquide progresse de 1 millimètre. D'autre part, les divers constituants du liquide fixateur diffusent à des vitesses très différentes, de telle sorte que l'on ignore la composition

exacte du liquide qui fixe les régions les plus profondes de l'organe; cette composition est vraisemblablement très éloignée de celle du liquide fixateur du départ".

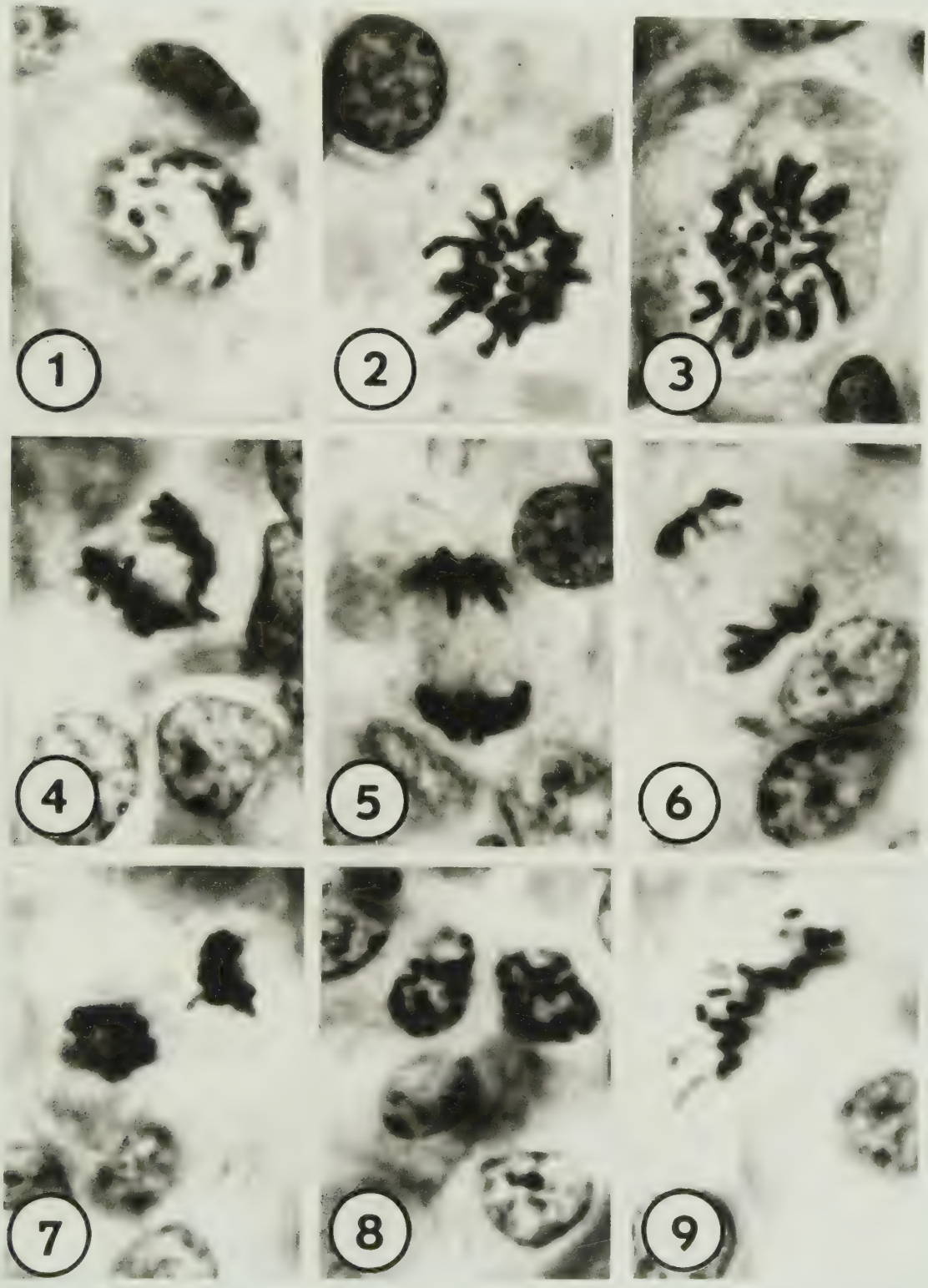

Figure 2 : Aspects des stades de la mitose après fixation par perfusion. 1 Prophase, 2 Prométaphase, 3 Métaphase, 4,5,6 Anaphase, 7 et 8 Télophase, 9 Métaphase d'une cellule endothéliale. (NOUET et KUJAS)

NOUET et KUJAS ont apporté l'explication de cette "perte de mitoses" dans les comptages après fixation par immersion. Les mitoses sont présentes, mais du fait de leur altération, elles ne peuvent être identifiées pour telles avec certitude, et elles ne sont pas totalisées. C'est donc une mauvaise qualité des images mitotiques qui entraîne une erreur du dénombrement. Seule la fixation par perfusion donne une image mitotique de bonne qualité.

c) Rythme nycthéméral des mitoses

J.C.NOUET (1974) a étudié les variations nycthémérales de l'activité mitotique dans l'adénohypophyse du rat mâle (figure 3).

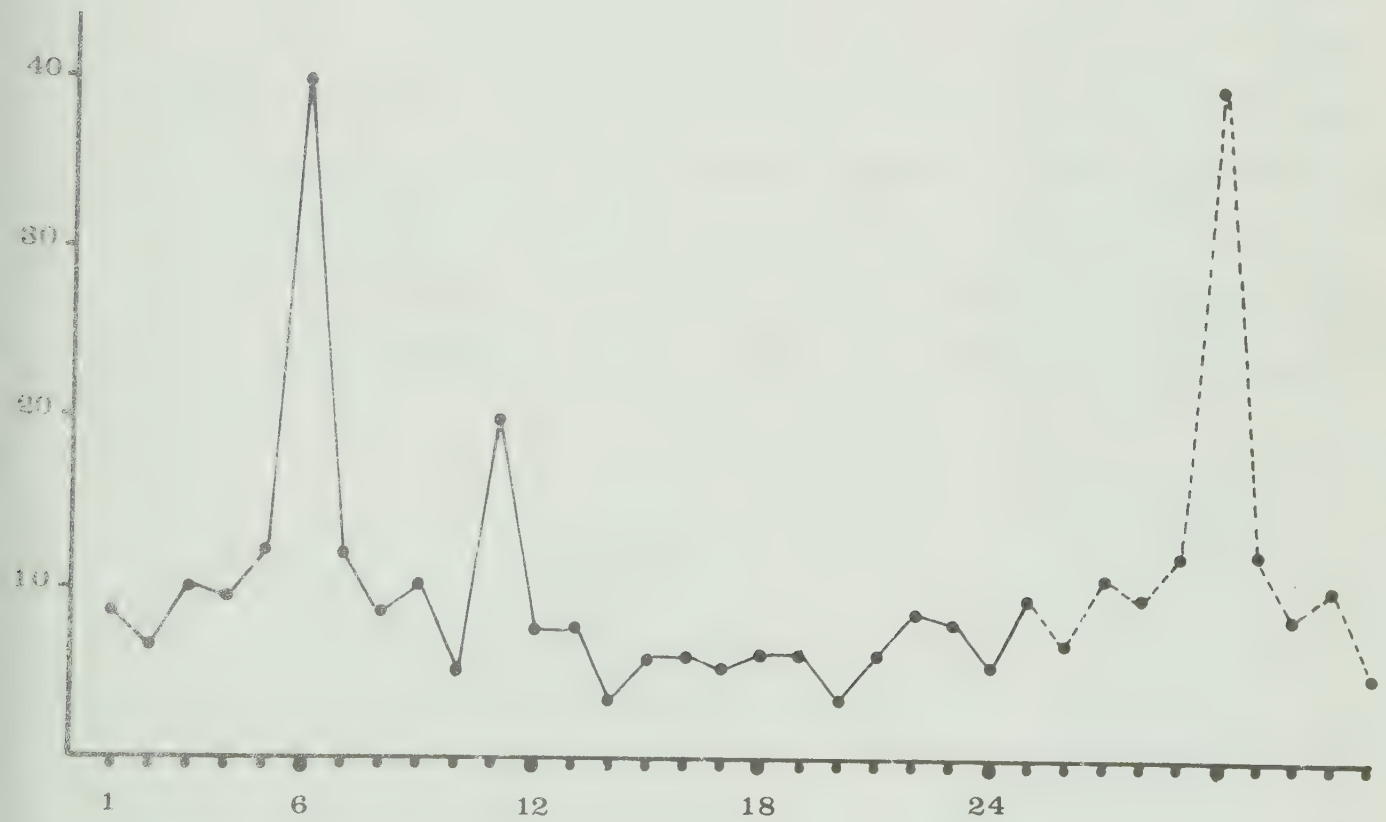

Figure 3 : Courbe des variations nycthémérales du nombre des mitoses par coupe horizontale d'adénohypophyse. (NOUET)
Les heures sont portées en abscisses et le nombre moyen des mitoses par coupe horizontale en ordonnées.

De cette courbe, on déduit que l'activité mitotique la plus importante siège à 6 heures du matin puis à 11 heures. De plus, on peut remarquer que les "horaires de laboratoire", (habituellement compris entre 14 et 18 heures), pour confortables qu'ils soient, sont tout à fait inadaptés à l'étude des mitoses dans l'adénohypophyse. J.C.NOUET a conclu que la grande rareté habituellement attribuée aux mitoses de l'adénohypophyse est due à l'emploi d'une technique de fixation inadaptée, et à la méconnaissance des variations de l'activité mitotique.

d) Caractères particuliers de la répartition topographique des mitoses

Pendant ses observations, J.C. NOUET a constaté que les mitoses paraissent se répartir d'une façon particulière à l'intérieur du parenchyme de l'adénohypophyse. Il a pu dire que "les mitoses sont comme les champignons; quand on en trouve une, il faut chercher autour"! D'autre part, il a noté l'existence de nombreuses mitoses situées strictement côte à côte et généralement au même stade.

Ces constatations nous ont donc amené à entreprendre l'étude approfondie de la répartition et du groupement des mitoses dans l'adénohypophyse du rat mâle.

II - TECHNIQUE

Le choix des conditions expérimentales a tenu compte de différents facteurs :

1°) Le choix des animaux

a) Sexe

Nous avons utilisé des rats mâles de souche Wistar, afin d'éliminer la possibilité de variations cycliques des mitoses chez la femelle. Au moment de leur sacrifice, tous les animaux étaient âgés de 49 jours. Ils étaient donc pubères, la puberté survenant à 5 semaines dans cette espèce.

b) Conditions d'élevage des animaux

Les animaux sont nés dans un élevage industriel, condition la meilleure pour être assuré de la pureté de la race. Mais ils ont passé au moins 9 jours à l'animalerie du laboratoire de notre service (laboratoire d'Histologie-Embryologie, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière) afin que nous soyions assurés de leur rythme nycthéméral.

c) Poids des animaux

Pendant ce délai, la courbe de croissance des animaux a été établie par pesée quotidienne à la même heure. Tous les animaux présentant une irrégularité de leur courbe de croissance ont été éliminés : nous n'avons utilisé que ceux dont la croissance était régulière. Le poids de ces rats était compris, au moment de leur sacrifice entre 205 et 248 g.

2°) La perfusion de liquide fixateur

Les rats ont été tués par perfusion de liquide de Bouin Hollande. Nous décrivons ci-dessous le protocole de cette technique.

a) Anesthésie

L'animal est placé dans une enceinte hermétique contenant de l'éther anesthésique; l'endormissement apparaît en une minute environ. Pour faciliter le cathétérisme d'une de ses veines, la queue du rat est plongée dans de l'eau chaude (à 50° environ) afin de provoquer une vasodilatation locale. Le rat est ensuite anesthésié par injection intra veineuse d'Amobarbital à raison de 1,25 mg pour 10 g de poids. La dilution choisie nécessite l'injection de 1,5 ml environ d'anesthésique mélangé à 0,1 ml d'héparine.

Le rat est placé sur le dos dans un plateau métallique et sa position est maintenue par du ruban adhésif aux 4 pattes. La profondeur de l'anesthésie est contrôlée par pression sur les orteils d'une patte postérieure et l'anesthésique poussé jusqu'au degré d'anesthésie "chirurgicale" respectant la respiration spontanée.

b) Mise en place de la perfusion

Le thorax est ouvert et l'oreillette droite largement fendue. On ouvre alors le ventricule gauche à la pointe du coeur et on y introduit un trocard mousse qui ne doit pas atteindre les valvules sigmoïdes. Ce trocard est fixé en le pinçant perpendiculairement avec une pince de Kocher au travers du myocarde de façon à assurer l'étanchéité. Le système vasculaire du rat est lavé par 20 cm^3 de serum physiologique à 37°. Ce serum est poussé manuellement à la seringue en 10 secondes.

c) Perfusion

On adapte alors sur le trocard une perfusion de Bouin-

Hollande, sous une pression de 12 cm de mercure pendant une minute 30 secondes.

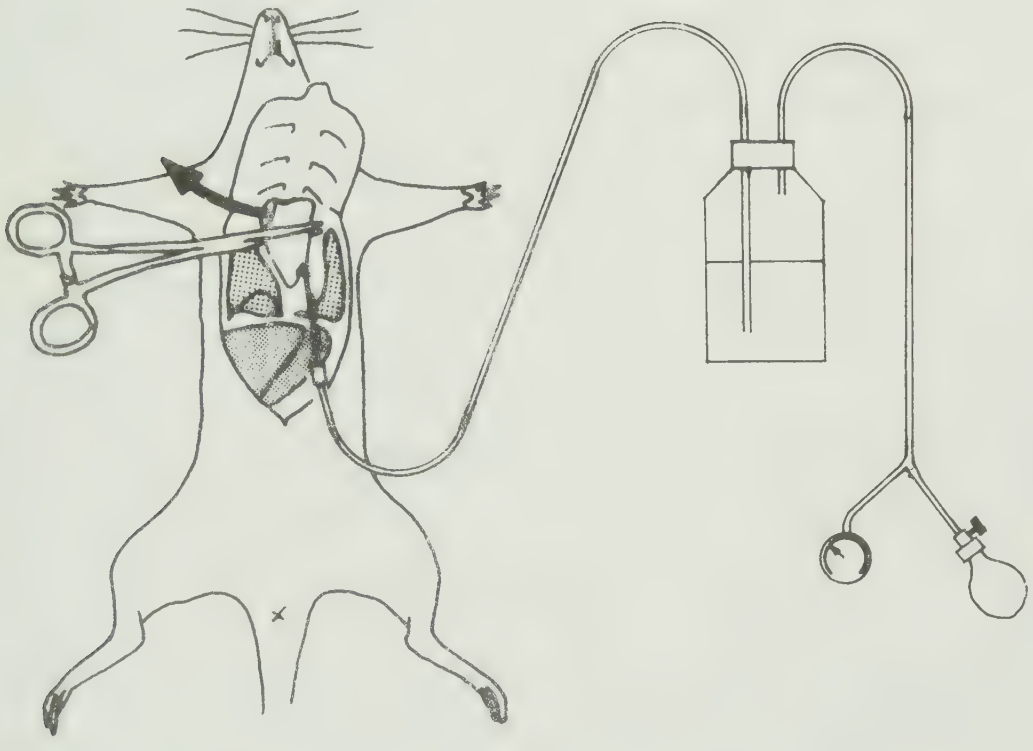

Figure 4 : Dispositif de perfusion de liquide fixateur.

Le trocard est maintenu en face de l'origine de l'aorte par la pince de Kocher. Après son circuit dans la grande circulation, le liquide s'écoule par l'ouverture pratiquée dans l'oreillette droite.

Les opérations doivent s'effectuer rapidement mais avec douceur et soin, de façon à éviter tout tiraillement du pédicule vasculaire, toute irritation des zones réflexogènes aortiques et sigmoïdiennes, et de façon à éviter le passage de bulles d'air dans la perfusion.

Pendant la durée de la perfusion, la pression est contrôlée en permanence au manomètre et ramenée au niveau de 12 cm de mercure à l'aide d'une poire.

d) Post fixation

La perfusion terminée, on prélève l'hypophyse en tranchant au bistouri fin le sac de dure-mère qui l'enveloppe, après avoir enlevé d'un bloc l'encéphale et le cervelet fixés.

L'hypophyse est ensuite plongée pendant 24 heures dans du liquide de Bouin-Hollande afin de parachever la fixation.

2°) Confection des coupes

a) Inclusion

Les hypophyses sont incluses à plat en paraffine en leur donnant la même orientation.

b) Epaisseur des coupes

Les coupes sont faites à 7 microns d'épaisseur. Cette épaisseur de 7 microns a semblé la plus opportune. Une épaisseur moindre peut entraîner une diminution du nombre des mitoses observées : la coupe peut en effet passer plus facilement en dehors du plan de la mitose, ou n'entamer qu'une partie de la figure mitotique, rendant ainsi le stade difficile à identifier.

A l'opposé, une épaisseur plus importante entraîne une augmentation des superpositions cellulaires et une difficulté d'observation au microscope.

c) Coloration

Les coupes sont colorées à l'hématéine pendant 3 minutes. Cette coloration donne un contraste satisfaisant et suffisant entre les noyaux et le fond de la préparation.

4°) Technique d'observation

a) Grossissement

Chaque coupe est examinée au microscope, "champ par champ", au grossissement X 400.

b) Réticule

Le "champ" d'observation est la portion de la préparation visible dans un réticule incorporé à l'oculaire du microscope. Ce réticule a une forme carrée; au grossissement utilisé son côté représente 213 microns, sa surface est donc de 45369 microns carrés.

c) Carte des mitoses

Chaque mitose est repérée et pointée sur un quadrillage carré. On note son stade.

Par balayage de proche en proche, on obtient un relevé topographique agrandi de la coupe, portant la situation de chaque mitose, son stade, et le contour exact de l'objet (figure 5).

d) Stades de la mitose

Les stades de la mitose sont répertoriés comme prophase (en y incluant la prométaphase), métaphase, anaphase et télophase. Nous y ajoutons un stade "indéterminé". Il s'agit de mitoses indiscutables, mais dont il n'est pas possible d'identifier le stade avec certitude du fait de l'incidence du plan de coupe.

5°) Matériel observé

a) Premier lot de préparations

La première tranche de nos observations a porté sur les

Figure 5 : Relevé topographique des mitoses dans une coupe horizontale d'adénohypophyse.

prophase ● métaphase ★ anaphase ✱ télophase ▼
indéterminés +

hypophyses de 8 rats mâles issus de fratries différentes. Ces animaux ont été sacrifiés entre 15h 30 et 16h 30. Les coupes ont été faites à 7 microns d'épaisseur; nous avons observé une coupe sur 7 soit environ une coupe tous les 50 microns. Nous avons examiné 10 coupes par hypophyse, au total 80 coupes horizontales d'hypophyse.

b) Deuxième lot de préparations

Le deuxième lot était constitué par les hypophyses de 3 rats mâles sacrifiés par perfusion de Bouin-Hollande à 5h 30, 6heures et 6h 30, en raison du pic d'hyperactivité mitotique. Les coupes ont été pratiquées là aussi à 7 microns d'épaisseur, mais leur montage effectué en série continue. Chacun des relevés topographiques portant situation et stade de la mitose est transcrit sur un papier calque. En superposant les calques successifs, cette technique nous permet d'avoir, sur le même plan, la représentation de ce qui se passe dans un volume d'adénohypophyse.

Nous avons étudiés 14 plans successifs pour chacune des trois hypophyses, comptant les mitoses, notant leur stade et relevant leur situation sur un quadrillage. Ces résultats obtenus, nous avons reconstitué une série de 7 plans puis une série de 14 plans successifs pour chaque hypophyse.

III - RESULTATS

1°) Les mitoses dans le parenchyme : "constellations" de mitoses, "zones sans mitose" et "bruit de fond".

a) Premier lot de préparations

Dans cette série de 80 coupes horizontales d'hypophyse nous avons dénombré 1987 mitoses réparties ainsi :

Prophases	583	soit 30 %
Métaphases	498	soit 24 %
Anaphases	242	soit 12 %
Télophases	541	soit 28 %
Stades Indéterminés	123	soit 6 %

La figure 5 reproduit le relevé topographique des mitoses dans une de ces coupes prise au hasard. Le balayage de proche en proche a permis de situer chaque mitose avec précision et de noter son stade. Devant l'apparente hétérogénéité de la distribution, reproduite à chacun des niveaux étudiés, nous avons pris en considération la proximité des mitoses les unes par rapport aux autres,et nous avons étudié plus particulièrement les "groupes" constitués par deux mitoses distantes de moins de 50 microns quant à leur fréquence et leur stade.

Dans l'ensemble de ces 80 coupes constituant le premier lot, nous avons dénombré 160 de ces groupes. Les stades des mitoses constituant ces groupes se distribuent de la façon indiquée dans le tableau suivant :

Prophases	22			
Métaphases	29	24		
Anaphases	7	10	4	
Télophases	13	23	9	19

Prophases Métaphases Anaphases Télophases

Dans chaque case de ce tableau figure un type de groupe associant 2 stades de la mitose. Pour connaître le stade des deux mitoses du groupe, il suffit de se reporter aux indications portées en abscisse et en ordonnées. Les nombres représentent les groupes : les mitoses sont donc 2 fois plus nombreuses.

Les stades indifférenciés ont été éliminés de ce comptage parce que non classables en groupes.

b) Deuxième lot de préparations

Pour passer de l'étude dans un plan à l'étude dans l'espace nous avons étudié des coupes pratiquées en série continue. Les hypophyses étaient supposées contenir un grand nombre de mitoses puisque les animaux avaient été tués au moment même du pic d'activité mitotique.

Hypophyse n° 230

L'étude de 7 plans successifs donne les résultats numériques suivants :

Prophases	67	soit	26 %
Métaphases	86	soit	33 %
Anaphases	20	soit	7 %
Télophases	70	soit	27 %
Stades indéterminés	19	soit	7 %
Total	262		

L'animal a été sacrifié à 5h 37.

Hypophyse n° 229

L'étude de 7 plans successifs donne les résultats numériques suivants :

Prophases	380	soit	56 %
Métaphases	193	soit	28 %
Anaphases	37	soit	5 %
Télophases	45	soit	7 %
Stades indéterminés	21	soit	4 %
Total	676		

L'animal a été sacrifié à 6 heures.

Hypophyse n° 233

L'étude de 7 plans successifs donne les résultats numériques suivants :

Prophases	228	soit	46 %
Métaphases	168	soit	35 %
Anaphases	37	soit	7 %
Télophases	36	soit	7 %
Stades indéterminés	26	soit	5 %
Total	495		

L'animal a été sacrifié à 6h 30.

En superposant les 7 relevés successifs d'une série, nous obtenons une carte qui donne une idée de la situation dans l'espace des mitoses, le volume épais de 50 microns étant réduit à un plan. Ces cartes sont l'objet des figures 6, 7, 8.

Figure 6 : Carte de la situation topographique des mitoses sur 50 microns d'épaisseur (7 plans superposés), sans tenir compte des stades. Hypophyse n° 230.

Figure 7 : Carte de la situation topographique des mitoses sur 50 microns d'épaisseur (7 plans superposés), sans tenir compte des stades. Hypophyse n° 229.

Figure 8 : Carte de la situation topographique des mitoses sur 50 microns d'épaisseur (7 plans superposés), sans tenir compte des stades. Hypophyse n° 233.

On constate d'une façon plus nette l'existence de régions riches en mitoses que nous dénommons "constellations" et de régions qui en sont dépourvues ou "zones sans mitose".

"Constellations" et "zones sans mitose" ont une forme circulaire, mais des tailles diverses. L'espace restant entre ces régions circulaires est occupé par des mitoses en nombre non négligeable, mais moins important que dans les constellations, constituant en quelque sorte un "bruit de fond".

L'étude de 14 plans successifs a été menée sur l'hypophyse n° 229, la plus riche en images mitotiques. Les résultats numériques sont les suivants :

Prophases	772	soit	54 %
Métaphases	454	soit	31 %
Anaphases	77	soit	5 %
Télophases	93	soit	7 %
Stades indéterminés	40	soit	3 %
Total	1436		

La constitution d'une carte topographique par superposition ramène à un plan une épaisseur de 100 microns. La figure 9 reproduit la carte ainsi construite. Les zones sans mitose, les constellations et le bruit de fond semblent se confondre et la répartition semble s'homogénéiser malgré la persistance d'une volumineuse zone sans mitose.

2°) Les "paires de mitoses"

Dans l'ensemble des préparations que nous avons examinées dans les deux lots, nous avons découvert 48 "paires de mitoses", c'est à dire des mitoses se déroulant simultanément dans deux cellules contigües (figure 10). Le relevé topographique des paires ne fait pas apparaître une situation pré-

Figure 9 : Carte de la situation topographique des mitoses sur 100 microns d'épaisseur (14 plans superposés), sans tenir compte des stades. Hypophyse n° 229.

férentielle dans telle ou telle région du parenchyme.

A l'intérieur de ces paires, les stades des mitoses se répartissent ainsi :

Prophases	29			
Métaphases	0	13		
Anaphases	0	0	0	
Télophases	0	3	0	3
	Prophases	Métaphases	Anaphases	Télophases

Le nombre des paires est indiqué par les nombres figurant dans chaque case. Les stades constituant les paires sont notés en abscisse et en ordonnée; le nombre des mitoses est donc le double du nombre des paires.

Nous avons également observé un "triplet" formé par l'ensemble de trois cellules contigües parvenues toutes les trois au stade prophase.

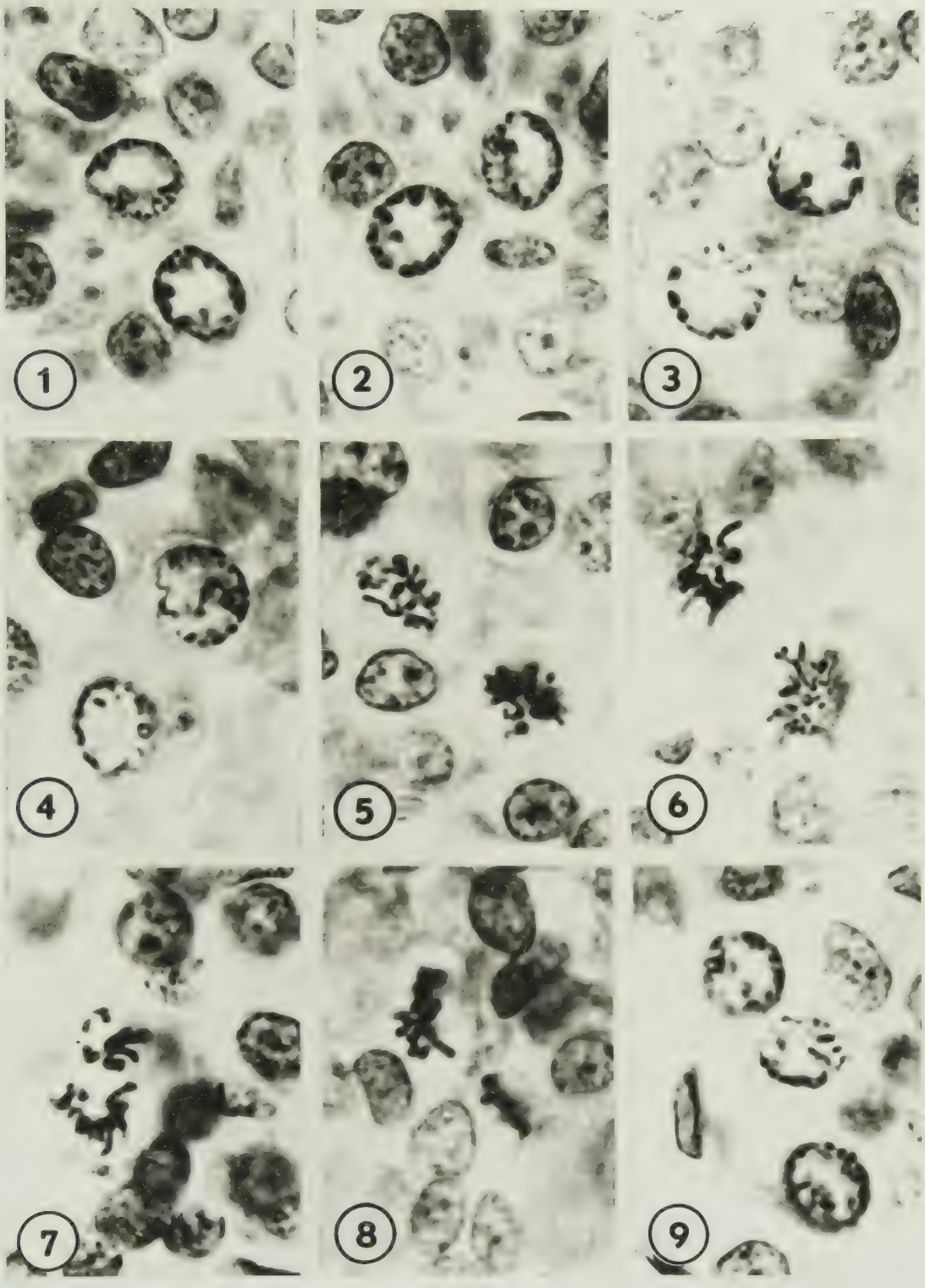

Figure 10 : Les "paires" de mitoses
On notera la simultanéité des processus mitotiques. 1,2,3,4, paires de prophases. 5 prométaphases. 6,7,8 métaphases. 9 triplet de prophases.

IV - DISCUSSION

Ces divers résultats soulèvent un certain nombre de questions; nous nous efforcerons de répondre à certaines, mais d'autres resteront actuellement sans réponse :

1°) L'existence des "constellations" n'est-elle pas due au hasard ?

2°) Quelle est la forme et quel est le volume des "constellations" et des "zones sans mitose" ?

3°) Quelle est la signification des"zones sans mitose" des "constellations" et du "bruit de fond" ?

4°) Quelle est la signification des "paires" de mitoses ?

1°) L'existence des "constellations" n'est-elle pas due au hasard ?

L'observation du premier lot de préparations nous a montré 160 groupes de deux cellules situées à moins de 50 microns l'une de l'autre sur un total de 1987 mitoses. Si sur une coupe on trouve une mitose, on a par conséquent $\frac{320}{1987} = 16\ \%$ de chance d'en trouver une autre à une distance inférieure à 50 microns.

Si les mitoses étaient réparties au hasard et d'une façon homogène, le pourcentage serait différent. Un champ de 213 microns de côté et 7 microns d'épaisseur contient une moyenne de $440 \pm 13{,}8$ cellules. La surface totale des 80 coupes horizontales représente 5260 champs soit 2314400 cellules. Un cercle de 50 microns de rayon contient 80 cellules. Si la cellule qui est située au centre est en mitose, on a $\frac{80 \times 1987}{2\ 314\ 400} = 6{,}8\ \%$ de chances de rencontrer une autre mitose dans le cercle considéré.

La comparaison de ces deux résultats montre que la proximité des mitoses, c'est à dire l'existence même d'un rassemblement des mitoses dans un plan , n'est pas due au hasard puisque les chiffres observés sont 2,4 fois supérieurs à ce que la théorie laisse prévoir.

Sur l'ensemble de 7 coupes en série, nous avons dénombré les mitoses présentes dans les "constellations", dans les "zones sans mitose" et dans le "bruit de fond", afin de comparer les 3 densités mitotiques.
Le tableau suivant expose les nombres obtenus. Chaque case montre le nombre moyen de mitoses par champ, et par parenthèses les chiffres extrêmes.

	Constellations	Bruit de fond	Zone sans mitose
Hypophyse n° 229	13 (10-18)	5 (4-5)	0
Hypophyse n° 230	7 (5-8)	3 (2-4)	0
Hypophyse n° 233	11 (9-12)	4 (2-5)	0

L'étude statistique démontre que la différence entre le nombre des mitoses au niveau des "constellations" et le nombre des mitoses au niveau du "bruit de fond" est significative avec un seuil de probabilité inférieur à 1°/$_{oo}$.
Nous en concluons que les "constellations" comme les "zones sans mitose " sont une réalité histologique.

2°) Quelle est la forme et quel est le volume des "constellations" et des "zones sans mitose" ?

La forme des constellations et des zones sans mitose est toujours circulaire sur nos relevés. Leur forme dans l'espace doit être sphérique.

En effet, si ces régions avaient une forme cylindrique, on pourrait sur nos relevés observer des constellations ou des zones sans mitose de forme rectangulaire et surtout elliptique, ce que nous n'avons jamais noté.

D'autre part, si les mitoses étaient réparties dans des cylindres, NOUET et KUJAS n'auraient pas observé que la répartition des mitoses se fait selon une droite, à l'intérieur du parenchyme hypophysaire (en partant de la périphérie et en s'enfonçant progressivement), mais selon une ligne brisée. En effet leur étude de la répartition topographique des mitoses constitue une représentation de ce qui se passe dans une tranche de 500 microns d'épaisseur. Dans cette tranche, on voit disparaître l'hétérogénéité de la répartition des mitoses. L'étude d'une bande de 500 microns de largeur sur une même coupe donne le même résultat que l'observation d'une tranche de 500 microns d'épaisseur obtenue par la superposition de plans horizontaux différents. On peut donc dire que si la répartition des mitoses est homogène dans une série de plans parallèles, elle sera également homogène quelque soit le plan de coupe. En conséquence, puisqu'il y a groupements, ces groupements ne peuvent être que des sphères.

Le diamètre des "constellations" et des "zones sans mitose" peut être estimé grâce au réticule oculaire. Nous l'évaluons à 400 microns environ pour les plus grandes, aussi bien pour ce qui concerne les "constellations" que pour les"zones sans mitose". Or, en général, les zones circulaires que nous observons sont de tailles différentes sur nos relevés. Deux explications pourraient être données :

- ou bien les "constellations" et "les zones sans mitose" ont réellement des tailles différentes,

- ou bien cet aspect n'est dû qu'à l'incidence de la coupe par rapport à la sphère.

Il ne nous est pas possible de choisir entre ces deux explications,

qui vraisemblablement coexistent.

3°) Quelle est la signification des "zones sans mitose", des "constellations" et du "bruit de fond" ?.

Un grand nombre d'hypothèses a été avancé pour trouver une cause au déclenchement des mitoses dans un organisme.

- L'action de substances mitogénétiques a pu être évoqué par différents auteurs. OELKERS en 1935 a envisagé l'existence des "mithormones". WILDER a décrit des "auxines" et des "héterauxines" isolées des levures. HABERLANDT enfin a imaginé l'existence de traumathormones : hormones apparaissant après une blessure.

- De nombreux auteurs ont décrit l'activation des mitoses par l'administration d'hormone de croissance d'origine hypophysaire à un certain stade du développement par exemple lors de la métamorphose des batraciens.

- GURWITSCH avait cru pouvoir interpréter certains résultats en supposant l'existence de "rayons mitogénétiques" agissant par induction sur les cellules voisines à partir de mitoses de voisinage.

- De son côté, DUSTIN avait signalé des "ondes de mitoses" dans le thymus et certains organes lymphoïdes.

- Enfin pour certains auteurs, il semble exister dans l'organisme des facteurs inhibiteurs qui empêcheraient les cellules de se diviser alors qu'elles en seraient cependant capables. D'après BULLOUGH et ses collaborateurs (1960-1965) ces substances ou "cholones" abaissent l'activité mitotique; elles se trouvent dans les tissus, sont peut-être produites par eux et pourraient être spécifiques du tissu en cause.

D'une façon générale, chacune de ces théories apporte seulement une explication fragmentaire, et toujours dans des circonstances particulières. Pour résumer, nous pouvons exprimer que le déclenchement de la multiplication cellulaire peut être la conséquence soit d'une "stimulation", elle-même "externe" ou "interne", soit d'une "levée d'inhibition", elle aussi "externe" ou "interne". Les facteurs "externes" étant dûs à l'influence sur la cellule de son environnement, proche ou à distance; les facteurs "internes" étant eux, contenus dans la cellule elle-même.

De nombreuses expérimentations ont démontré que les cellules endocrines sont sensibles à des "stimulations externes". Sous une telle influence, les cellules endocrines sont le siège d'une extrusion, d'une augmentation des synthèses et d'une hyperplasie. Le test de Max ARON démontre l'action de la TSH sur la thyroïde: on observe une disparition de la colloïde par augmentation de son utilisation, une croissance de la hauteur des cellules thyroïdiennes formant la vésicule, et une apparition de mitoses. L'action de corticolytiques (RACADOT sur le chat) ou la gestation, ou encore toute circonstance activant la glande surrénale y provoquent l'apparition de mitoses. Chez la femme, la grossesse entraîne une augmentation de taille de l'hypophyse, qui passe de 0,5 g ou 0,6 g à 0,9 g jusqu'à 1,2 g; si la congestion vasculaire peut être tenue pour partiellement responsable, cette modification est due pour une bonne part (peut être 0,3 g) à l'hyperplasie des cellules à prolactine, qui en outre, synthétisent activement et accumulent les grains de sécrétion.

Activité glandulaire et activité mitotique sont donc fréquemment associées. La théorie de PRENANT qui les oppose l'une à l'autre n'est donc pas vérifiée, du moins au niveau du tissu; car au niveau de la cellule elle-même, il est très vraisemblable que l'extrusion et peut être même la

synthèse sont suspendues pendant le phénomène mitotique.

Pour ce qui concerne plus précisément l'adénohypophyse, on sait que la régulation de la sécrétion des cellules glandulaires se fait par l'intermédiaire de substances qui augmentent la sécrétion ou l'empêchent; ce sont les "releasing factor" (RF) et les "inhibiting factors" (IF). Ces substances, élaborées dans l'hypothalamus, libérées dans la tige, arrivent au contact des cellules de l'adénohypophyse par les vaisseaux portes hypophysaires. Les RF réalisent une stimulation externe de la sécrétion de l'adénohypophyse et les IF une inhibition externe. On peut supposer que des substances facilitant ou empêchant le déclenchement des mitoses arrivent par la même voie dans l'adénohypophyse. Ces substances peuvent être autres que les RF et les IF et restent alors à découvrir. Ou bien elles peuvent être les RF et les IF eux-mêmes.

Cette coexistence d'excitation et d'inhibition externes permettrait d'expliquer la coexistence de "constellations" et de "zone sans mitose". Une de nos observations pourrait confirmer l'intervention d'un processus "externe" de déclenchement de la mitose : en superposant les mitoses de 7 plans sur un seul graphique, compte tenu des stades, nous constatons que les mitoses sont, là encore, groupées en régions circulaires, régions qui ne se superposent pas toujours parfaitement.

Pour l'hypophyse n° 230 par exemple, nous avons constaté que les différents stades de la mitose ne se superposent absolument pas; il semble exister des "constellations" de prophases, d'autres de métaphases, d'autres de télophases, comme si coexistaient trois vagues de mitoses qui auraient débuté à des moments légèrements différents. Les anaphases sont trop peu nombreuses pour que leur distribution puisse être interprétée de manière

concluante.

De plus, en examinant l'hypophyse n° 229, nous constatons que pour les anaphases qui sont pourtant peu nombreuses, l'aspect de "constellation" apparaît néanmoins d'une façon très nette (figure 11). Sur un total de 37 anaphases, 14 sont groupées dans un cercle de 300 microns de diamètre. Le tableau de la page 18 nous a montré la constitution des groupes, c'est à dire de 2 cellules distantes de moins de 50 microns. Nous constatons que la répartition des stades à l'intérieur des 160 groupes observés est la suivante :

Prophases	93
Métaphases	110
Anaphases	34
Télophases	83
Total	320

Dans notre observation, la probabilité d'avoir dans un groupe deux mitoses au même stade est de :

$\frac{93}{320}$ = 28 % pour les prophases

$\frac{110}{320}$ = 33 % pour les métaphases

$\frac{34}{320}$ = 11 % pour les anaphases

$\frac{83}{320}$ = 27 % pour les télophases

Or nous avons observé 69 groupes dans lesquels les deux cellules présentaient le même stade de la mitose. Ceci représente 44 % des cas, donc une chance très nettement supérieure à la probabilité prévisible si la

Figure 11 : Carte de la situation des anaphases dans une épaisseur de 50 microns (7 plans superposés)
Hypophyse n° 229.

répartition des stades de la mitose s'était faite au hasard à l'intérieur des groupes, donc des "constellations". Par conséquent, on est en droit de penser que les mitoses de l'adénohypophyse sont probablement provoquées par des causes déclenchantes externes, ces causes déclenchantes étant décalées dans le temps d'une région à l'autre.

On peut se demander si ces causes déclenchantes sont ou non spécifiques d'un type cellulaire. En effet on peut considérer une cause déclenchante comme non spécifique si elle donne naissance à des "constellations" décalées dans le temps et contenant n'importe quel type cellulaire, et comme spécifique si les cellules en mitoses dans une "constellation" appartiennent au même type cellulaire. Nous ne pouvons pas actuellement apporter de réponse à cette question; nous résoudrons ultérieurement ce problème grâce aux méthodes d'identification des types cellulaires : tétrachrome de Herlant, PAS-orange G, immunofluorescence et microscopie électronique.

4°) Quelle est la signification des "paires" de mitoses ?

Du tableau de la page 26 il ressort que nous avons observé 48 "paires de mitoses", soit 96 cellules groupées de cette manière. Sur un total de 4856 mitoses observées, la probabilité, dans notre observation, de trouver une "paire" lorsque l'on a déjà trouvé une mitose est donc de

$$\frac{96}{4856} = 2\ \%$$

La probabilité théorique, sur l'ensemble des coupes d'observer une paire de mitose est de 0,7 %. Par conséquent, l'observation aboutit à une chance 3 fois supérieure à la chance prévisible.

En fait, les paires de mitoses sont certainement beaucoup plus nombreuses que l'observation nous le laisse supposer. En effet, la technique histologique ne permet d'étudier qu'un plan à la fois, et toutes les

"paires" de mitoses se déroulant dans un autre plan que celui de la coupe échappent bien entendu au comptage. De plus, dans les coupes en série continue, il est impossible d'affirmer que deux mitoses qui apparaissent très proches sur deux relevés successifs sont contigües dans le parenchyme glandulaire.

Il est possible de voir comment les "paires" de mitoses peuvent être méconnues. La figure 12 représente une portion d'adénohypophyse dans laquelle les noyaux ont été situés d'après une microphotographie. Les noyaux en grisé sont supposés être en mitose et assemblés par deux pour figurer 10 "paires".

Les traits parallèles figurent 3 orientations possibles du plan de la coupe dans l'espace. On voit que quel que soit ce plan, il échappe au moins 1/3 des paires de mitoses.

Nous pouvons remarquer que le nombre de "paires" méconnues sera d'autant plus important que l'épaisseur de la coupe est faible.

Les paires de mitoses correspondent probablement à des clônes cellulaires. Un clône cellulaire peut être défini comme un groupe de cellules strictement identiques les unes aux autres, toutes issues de la même cellule souche et dont les divisions sont synchrones.

Les cellules d'un clône étant obligatoirement de même type, seules les méthodes de colorations spécifiques permettront d'affirmer que les deux cellules constituant une "paire" appartiennent bien au même type et donc font partie d'un clône.

Mais à elle seule la fréquence de l'identité des stades de chaque "paire" de mitoses nous permet d'affirmer que le synchronisme que nous avons constaté n'est pas dû au hasard. Sur 48 "paires" observées, 45 fois les stades étaient strictement identiques, soit 94 % des cas. Ce synchronisme est un

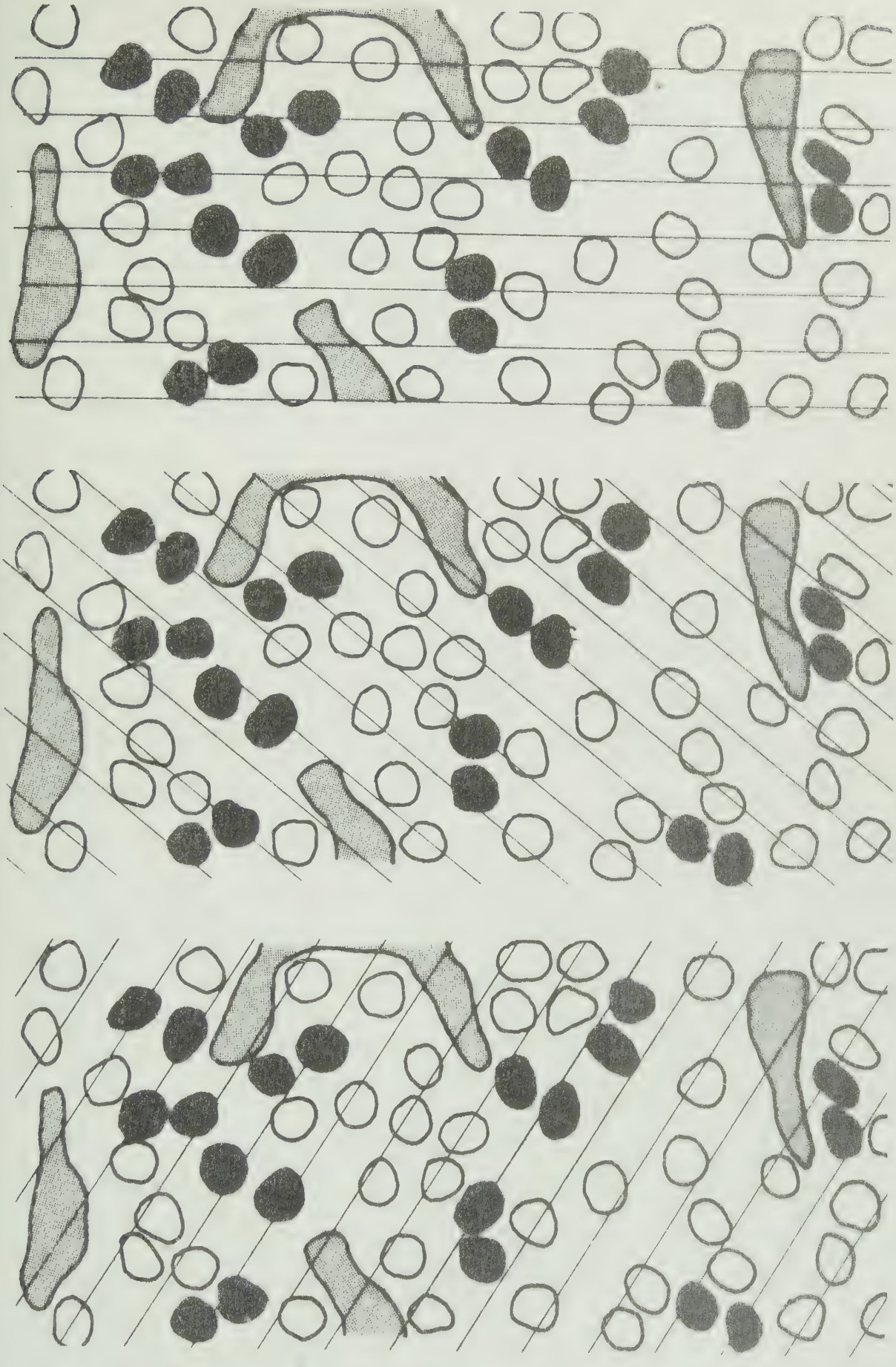

Figure 12 : Schéma explicatif du nombre de paires de mitoses méconnues.

argument de poids en faveur de l'existence de clônes cellulaires.

Nous n'avons pas observé d'aspects plus avancés d'un développement clônal : 4 ou 8 mitoses contigües. Mais cette observation n'est pas possible: d'une part en raison de l'arrangement dans l'espace des cellules filles qui figureront donc dans des plans de coupe différents, et d'autre part en raison de l'interposition vraisemblable de cellules voisines. On peut d'ailleurs penser qu'un certain nombre de "paires" appartiennent en réalité à des ensembles plus nombreux.

Nous avons pourtant observé un "triplet" formé de 3 cellules contigües en prophase. Le triplet est le témoin, dans un plan d'un ensemble de 4 cellules (au moins). Il apporte, malgré son caractère unique, une confirmation à l'hypothèse de l'existence de clônes cellulaires que nous avançons.

L'existence de tels clônes a déjà été observée dans d'autres organes : lignée séminale, érythropoïèse, granulopoïèse, lignée lymphoïde. Mais elle n'avait jamais été trouvée dans une glande endocrine. En raison des types cellulaires de l'adénohypophyse, l'existence de clônes revêt peut-être une signification très importante. Par exemple, nous savons que les adénomes de l'hypophyse sont dus à la prolifération de tel ou tel type cellulaire; on peut dès lors penser que le processus tumoral adénohypophysaire pourrait être issu d'une altération de la capacité mitotique d'un clône.

CONCLUSIONS

Nous avons observé 115 coupes horizontales d'adénohypophyse provenant de 11 rats mâles d'un poids moyen de 220 g.

Ces animaux ont été tués par perfusion de fixateur.

L'observation a permis de constater que les multiplications cellulaires ne sont pas réparties au hasard dans le parenchyme glandulaire.

Il apparaît que deux modes de groupement des mitoses coexistent . d'une part celles-ci sont rassemblées en régions que nous avons nommées "constellations", et d'autre part le parenchyme glandulaire renferme des clônes cellulaires.

Les constellations de mitoses

Dans ces régions riches, vues dans un plan de coupe, on a 17 % de chances de trouver deux mitoses distantes de moins de 50 microns, alors que cette fréquence n'est théoriquement que de 6,4 % pour l'ensemble de la coupe.

Dans le plan d'une coupe, la constellation a un contour circulaire. L'examen d'une série de coupe sur 150 microns d'épaisseur permet d'assimiler la forme des constellations à des sphères dont le diamètre ne dépasse pas 400 microns. Elles sont situées dans n'importe quelle région de l'adénohypophyse.

Dans une même constellation nous avons noté que les mitoses figurent à un stade identique et ceci avec une fréquence supérieure à ce que le hasard laisserait prévoir.

A côté des constellations nous avons noté la présence d'espaces totalement dépourvus de mitoses, que nous avons appelés zones sans mitose. Ces zones sans mitose ont un volume, une forme et une situation comparables aux constellations.
Constellations et zones sans mitose sont environnées par un tissu parenchymateux où règne une densité mitotique faible et uniforme.

Les clônes cellulaires

Nous avons observé la présence de mitoses contigües, images que nous avons dénommées "paires", et d'un triplet. La fréquence des paires est de une pour 100 mitoses.

Dans la même paire, comme dans le triplet, les mitoses figurent toujours au même stade.

Nous sommes donc amenés à penser que les cellules se multiplient au sein de clônes, mais nous ne pouvons pas préciser si ce mode de division atteint certaines catégories cellulaires ou si elles y répondent toutes.

BIBLIOGRAPHIE

1 - BOUIN P.
Eléments d'histologie
Tome I. Librairie Félix Alcan Paris 1929.

2 - BUGNON C., LENYS D. et MOREAU N.
La réponse proliférative provoquée de certains types cellulaires de l'adénohypophyse de rat.
Bull. Ass. Anat. (Nancy) 1967, 137, 275-285.

3 - CHEVREMONT M.
Notions de Cytologie et Histologie
Tome I. Editions Desoer, Liège 1966.

4 - COLLIN R.
L'hypophyse : travaux originaux et études.
Nancy, Georges Thomas 1933.

5 - DUBREUIL G., et CANIVENC R.
Manuel théorique et pratique d'Histologie.
Tome I, Vigot Frères, Paris 1967.

6 - GURWITSCH
Mophol. U. Biologie d. Zelle, Jena 1904.

7 - LEBLOND C.P., et WALKER B.E.
Renewal of cell populations.
Physiol. Rev. 1956, 36, 255-276.

8 - NOUET J.C.
Variations nycthémérales de l'activité mitotique dans l'adénohypophyse du rat mâle.
C.R.Soc. Biol., 1973, 167, n°12, 1725.

9 - NOUET J.C. et KUJAS M.
Influence de la méthode de fixation sur l'observation des divisions cellulaires dans l'adénohypophyse du rat mâle.
Z.Zellforsch., 1973, 143, 535-547.

10 - PRENANT A., BOUIN P. et MAILLARD L.
Traité d'Histologie
Tome I Cytologie générale et spéciale.Paris Reinwald 1904.

11 - RACADOT J.
Reproduction des cellules glandulaires.
Biologie Med., 1964, 53, n° 6, 700-727.

12 - SOYER C.
Etudes sur l'hypophyse.
Arch. Anat. Microsc., 1912, 14, 145-308.

Université de Paris VI

Faculté de Médecine Pitié Salpetrière

Année 1975

THÈSE
POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE
(DIPLOME D'ETAT)

MODES DE GROUPEMENT DES MITOSES DANS L'ADENOHYPOPHYSE DU RAT MALE PUBERE

PAR

LEFEVRE Alain

Né le 24 Avril 1944

A Rouvres St. Jean (Loiret)

Pour le Président de l'Université P. et M. Curie
(Paris VI)
et par autorisation
Le Vice-Président,

P. BERTHAUX

Présentée et soutenue publiquement le

Le Directeur de l'U.E.R.

Vu et accepté

Président : Mr J. Racadot, Professeur.

Prof. J. RACADOT